

酢浆草的HPLC指纹图谱建立及2种有效成分的含量测定[△]

李小双^{1,2*}, 李 银^{1,2}, 刘文静^{1,2}, 王广成¹, 郑 林³, 陈思颖³, 李勇军^{1#}(1. 贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心/省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学药学院, 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室, 贵阳 550004)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)06-0656-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.06.04

摘要 目的:建立酢浆草的高效液相(HPLC)指纹图谱,并同时测定其中异牡荆素、当药黄素的含量。方法:采用HPLC法。色谱柱为ACE Excel-5-C₁₈,流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液(梯度洗脱),流速为1 mL/min,柱温为35 ℃,检测波长为280 nm,进样量为10 μL。以异牡荆素峰为参照,绘制12批酢浆草药材样品的HPLC指纹图谱,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》进行相似度评价,确定共有峰。按上述色谱条件同法测定异牡荆素、当药黄素的含量。结果:12批酢浆草药材样品共有19个共有峰,相似度均大于0.89,同时指认异牡荆素、当药黄素2个共有峰。异牡荆素、当药黄素检测质量浓度的线性范围分别为3.91~117.36 μg/mL($r=0.999\ 4$)、9.88~118.56 μg/mL($r=0.999\ 2$);定量限分别为0.675、3.587 μg/mL;检测限分别为0.205、1.087 μg/mL;精密性、重复性、稳定性试验的RSD均小于2%;加样回收率分别为95.46%~99.10%(RSD=1.23%, $n=6$)、95.34%~101.23%(RSD=2.74%, $n=6$);平均含量分别为0.227~1.654、0.641~2.052 mg/g。结论:所建指纹图谱可用于酢浆草药材的质量控制;含量测定方法简便、准确,可用于同时测定其中2种成分的含量。

关键词 酢浆草;高效液相色谱法;指纹图谱;异牡荆素;当药黄素;含量测定

Establishment of HPLC Fingerprint and Content Determination of Two Components of *Oxalis corniculata*

LI Xiaoshuang^{1,2}, LI Yin^{1,2}, LIU Wenjing^{1,2}, WANG Guangcheng¹, ZHENG Lin³, CHEN Siying³, LI Yongjun¹(1. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM/State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 3. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the HPLC fingerprints of *Oxalis corniculata* and to simultaneously determine the contents of isovitexin and swertisin. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on ACE Excel-5-C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-0.1% phosphoric acid water (gradient elution) at the flow rate of 1 mL/min. The column temperature was 35 ℃, and detection wavelength was set at 280 nm. The sample size was 10 μL. Using isovitexin peak as reference, HPLC fingerprints of 12 batches of sample were drawn. The similarity evaluation was performed by using *Similarity Evaluation System of Chromatogram Fingerprint of TCM* (2012 edition) to determine common peaks. The contents of isovitexin and swertisin were determined by same method of above chromatogram. RESULTS: There were 19 common peaks in HPLC chromatogram of 12 batches of *O. corniculata*, with the similarity above 0.89. Two common peaks including isovitexin and swertisin were identified. The linear range of two components were 3.91-117.36 μg/mL ($r=0.999\ 4$) and 9.88-118.56 μg/mL ($r=0.999\ 2$), respectively. The limits of quantitation were 0.675 and 3.587 μg/mL; the limits of detection were 0.205 and 1.087 μg/mL, respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. The recoveries were 95.46%-99.10% (RSD=1.23%, $n=6$), 95.34%-101.23% (RSD=2.74%, $n=6$), respectively. The average contents were 0.227-1.654, 0.641-2.052 mg/g, respectively. CONCLUSIONS: Established fingerprints can be used for the quality control of *O. corniculata*; the content determination method is simple and accurate, and can be used for simultaneous determination of two components.

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.U1812403);中央引导地方科技发展专项项目(No.黔科中引地[2018]4006);贵州省科技计划项目(No.黔科合平台人才[2016]5613, No.黔科合平台人才[2016]5677);贵州省教育厅青年科技人才成长项目(No.黔科合KY字[2018]179);贵州医科大学学术新苗培养及创新探索专项项目(No.黔科合平台人才[2018]5779-12)

* 硕士研究生。研究方向:药效物质基础。E-mail:1406520401@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师,博士。研究方向:药效物质基础。E-mail:liyongjun026@126.com

KEYWORDS *Oxalis corniculata*; HPLC; Fingerprint; Isovitexin; Swertisin; Content determination

酢浆草为酢浆草科植物酢浆草(*Oxalis corniculata* L.)的新鲜或干燥全草,又称酸咪咪^[1],为贵州省少数民族常用药材,具有清热利湿、凉血消肿等功效^[2]。该药主要分布于我国华北、华中、华南及西南等地区^[3]。有研究发现,酢浆草主要含有黄酮类、酚酸类等成分^[4-7],具有抗

炎杀菌、活血化瘀、抗肿瘤、抗氧化、保肝等药理活性^[8-10]。本课题组前期的化学成分研究中,分离得到了其黄酮类的代表性成分异牡荆素、当药黄素^[11]。药理活性研究表明,异牡荆素具有抗癌、抗炎、抗氧化等作用^[9],当药黄素具有抗抑郁、抗炎等作用^[12-13]。

指纹图谱具有整体性、模糊性的特征,符合中医传统理论的特点,是中药质量控制的有效手段;传统单一化学成分的含量测定难以全面反映药材质量,而多指标含量测定可在一定程度上更为有效地保证药材质量,中药材指纹图谱结合多指标含量测定能全面地反映药材质量优劣,已成为中药质量控制的科学有效手段^[14]。目前,酢浆草收录于《贵州省中药材、民族药材质量标准》^[2]中,该标准仅对其生药及薄层鉴别作出规定;现有的关于酢浆草质量控制的研究中,也仅有对酢浆草中异牡荆素的定量研究^[15],且建立的指纹图谱均未指认共有峰^[16-17]。基于此,本研究采用高效液相色谱法(HPLC)建立了酢浆草的指纹图谱,并同时测定了其中异牡荆素、当药黄素的含量,旨在为其质量标准的完善提供参考。

1 材料

1.1 仪器

UltiMate3000型HPLC仪,包括系统控制器、低压梯度组件、温控样品室、输液泵、脱气组件、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、Chromleon 7.0色谱工作站(美国Thermo Fisher Scientific公司);AE240型十万分之一电子天平[梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司];Allegra64R型台式冷冻离心机(美国Beckman公司);KQ-5200B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);WP-UP-II-20型超纯水机(四川沃特科技发展有限公司)。

1.2 药品与试剂

当药黄素对照品(纯度:≥98%)、异牡荆素对照品(纯度:≥98%)均由贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室自制;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 药材

12批酢浆草样品(编号:S1~S12,贵州维康子帆药业股份有限公司),经贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室刘春花副教授鉴定为酢浆草科酢浆草属植物酢浆草(*O. corniculata* L.)的干燥全草。酢浆草药材信息来源详见表1。

2 方法与结果

2.1 指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱:ACE Excel-5-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~10 min, 10% A→26% A; 10~20 min, 26% A→27% A; 20~30 min, 27% A→29% A; 30~36 min, 29% A→32.5% A; 36~46 min, 32.5% A→39% A; 46~57 min, 39% A→55% A; 57~71 min, 55% A→80% A; 71~

77 min, 80% A→95% A);流速:1 mL/min;柱温:35 ℃;检测波长:280 nm;进样量:10 μL。

表1 酢浆草药材信息来源

Tab 1 Information source of *O. corniculata*

编号	批号	产地	采集时间
S1	20170209	贵州省安顺市	2017年2月
S2	20160420	贵州省兴义市	2016年4月
S3	20170503	贵州省兴义市	2017年5月
S4	20170312	贵州省安顺市	2017年3月
S5	20161126	贵州省贵阳市	2016年11月
S6	20170504	贵州省兴义市	2017年5月
S7	20170505	贵州省兴义市	2017年5月
S8	20170603	贵州省兴义市	2017年6月
S9	20170606	贵州省兴义市	2017年6月
S10	20170507	贵州省兴义市	2017年5月
S11	20170607	贵州省兴义市	2017年6月
S12	20170604	贵州省兴义市	2017年6月

2.1.2 混合对照品溶液的制备 取异牡荆素对照品、当药黄素对照品各10 mg,精密称定,分别置于10 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制得异牡荆素、当药黄素质量浓度分别为0.978、0.988 mg/mL的单一对照品贮备液。取上述异牡荆素对照品贮备液0.3 mL、当药黄素对照品贮备液0.4 mL,置于5 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀,制得含异牡荆素、当药黄素质量浓度分别为0.0587、0.0790 mg/mL的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取酢浆草粉末(过50目筛)约1 g,精密称定,置于100 mL具塞锥形瓶中,加70%乙醇25 mL,超声(功率:200 W,频率:40 kHz)处理30 min,取出,放冷,用70%乙醇补足减失的质量,摇匀,取上层液,置于离心管中以12 000 r/min离心10 min,取上清液,即得供试品溶液。

2.1.4 精密度试验 取“2.1.3”项下供试品溶液(编号:S2)适量,按“2.1.1”项下色谱条件进样平行测定6次,以异牡荆素的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,19个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3%(n=6),表明方法精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 取“2.1.3”项下供试品溶液(编号:S2)适量,分别于室温下放置0、3、6、9、12、24 h时,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,以异牡荆素的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,19个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3%(n=6),表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.1.6 重复性试验 取酢浆草药材样品(编号:S2)粉末约1 g,共6份,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,以异牡荆素的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,19个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3%(n=6),表明方法重复性良好。

2.1.7 HPLC指纹图谱的生成 取12批酢浆草药材样

品粉末,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》进行HPLC图谱分析,详见图1、图2。

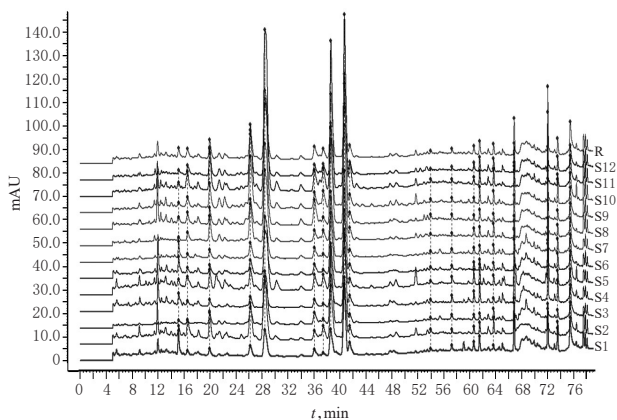


图1 12批酢浆草药材样品的HPLC叠加指纹图谱
Fig 1 HPLC superimposed fingerprint of 12 batches of *O. corniculata*

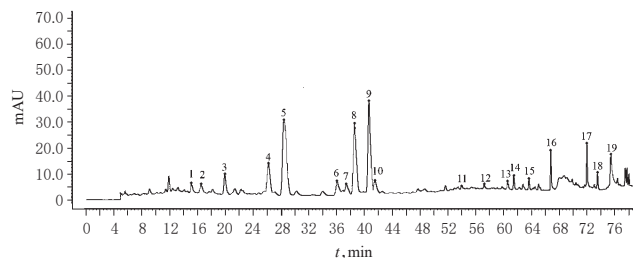


图2 酢浆草药材样品的HPLC对照指纹图谱
Fig 2 HPLC control fingerprint of *O. corniculata*

2.1.8 相似度分析 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》,以12批酢浆草药材样品的HPLC对照指纹图谱为对照,进行整体相似度评价。结果,12批酢浆草药材样品的相似度均大于0.89,表明各批酢浆草药材样品间化学成分一致性良好,详见表2。

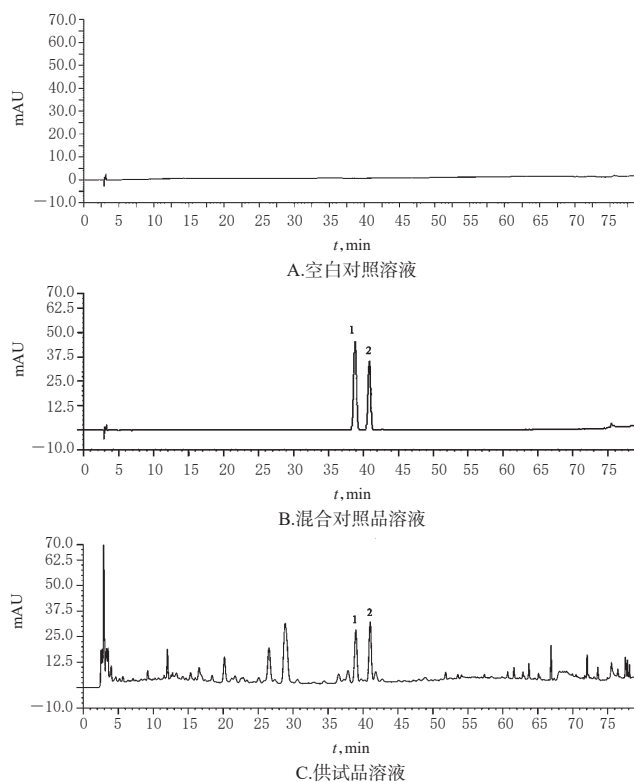
表2 相似度评价结果

Tab 2 Results of similarity evaluation

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	对照(R)
S1	1.000	0.836	0.897	0.989	0.801	0.895	0.908	0.839	0.866	0.869	0.827	0.831	0.892
S2	0.836	1.000	0.929	0.837	0.904	0.953	0.932	0.995	0.968	0.984	0.982	0.995	0.985
S3	0.897	0.929	1.000	0.900	0.823	0.987	0.993	0.930	0.982	0.955	0.957	0.922	0.972
S4	0.989	0.837	0.900	1.000	0.813	0.903	0.914	0.833	0.871	0.866	0.828	0.829	0.894
S5	0.801	0.904	0.823	0.813	1.000	0.876	0.838	0.894	0.878	0.885	0.877	0.900	0.907
S6	0.895	0.953	0.987	0.903	0.876	1.000	0.994	0.945	0.986	0.959	0.964	0.940	0.983
S7	0.908	0.932	0.993	0.914	0.838	0.994	1.000	0.926	0.974	0.944	0.945	0.917	0.970
S8	0.839	0.995	0.930	0.833	0.894	0.945	0.926	1.000	0.970	0.991	0.986	0.999	0.985
S9	0.866	0.968	0.982	0.871	0.878	0.986	0.974	0.970	1.000	0.983	0.988	0.967	0.992
S10	0.869	0.984	0.955	0.866	0.885	0.959	0.944	0.991	0.983	1.000	0.993	0.991	0.993
S11	0.827	0.982	0.957	0.828	0.877	0.964	0.945	0.986	0.988	0.993	1.000	0.987	0.989
S12	0.831	0.995	0.922	0.829	0.900	0.940	0.917	0.999	0.967	0.991	0.987	1.000	0.983
对照(R)	0.892	0.985	0.972	0.894	0.907	0.983	0.970	0.985	0.992	0.993	0.989	0.983	1.000

2.1.9 共有峰的指认及相关分析 12批酢浆草药材样品共有19个共有峰。通过与混合对照品HPLC图谱(图3B)比对,指认了2个共有峰,即8号峰为异牡荆素,9号

峰为当药黄素。其中异牡荆素响应值较高、分离度较好,故以此峰为参照,计算其他共有峰的相对保留时间和相对峰面积,详见表3、表4。



注:1.异牡荆素;2.当药黄素

Note: 1. isovitexin; 2. swertisin

图3 高效液相色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms

表3 12批酢浆草药材样品HPLC指纹图谱共有峰的相对保留时间

Tab 3 Relative retention time of common peaks in HPLC fingerprint of 12 batches of *O. corniculata*

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	RSD, %
1	0.395	0.391	0.392	0.390	0.394	0.391	0.391	0.395	0.395	0.395	0.394	0.392	0.51
2	0.426	0.431	0.430	0.428	0.429	0.430	0.430	0.426	0.430	0.431	0.430	0.425	0.49
3	0.519	0.518	0.517	0.515	0.517	0.517	0.517	0.518	0.517	0.517	0.517	0.516	0.17
4	0.682	0.680	0.679	0.678	0.679	0.679	0.679	0.680	0.679	0.680	0.680	0.678	0.16
5	0.745	0.738	0.736	0.736	0.737	0.737	0.737	0.737	0.736	0.737	0.737	0.736	0.32
6	0.937	0.936	0.935	0.935	0.935	0.935	0.935	0.935	0.935	0.935	0.935	0.934	0.06
7	0.971	0.970	0.969	0.970	0.970	0.970	0.970	0.970	0.969	0.970	0.970	0.970	0.05
8	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
9	1.053	1.053	1.054	1.053	1.054	1.054	1.054	1.054	1.054	1.055	1.055	1.055	0.06
10	1.074	1.077	1.075	1.078	1.076	1.077	1.076	1.074	1.076	1.075	1.075	1.076	0.11
11	1.391	1.394	1.400	1.396	1.399	1.398	1.401	1.398	1.401	1.399	1.399	1.404	0.24
12	1.476	1.479	1.485	1.481	1.484	1.483	1.485	1.482	1.487	1.484	1.483	1.488	0.23
13	1.562	1.566	1.573	1.567	1.571	1.570	1.573	1.570	1.574	1.571	1.570	1.576	0.24
14	1.585	1.590	1.596	1.590	1.594	1.593	1.596	1.593	1.597	1.594	1.593	1.600	0.25
15	1.640	1.645	1.651	1.646	1.650	1.649	1.652	1.648	1.654	1.650	1.649	1.656	0.25
16	1.721	1.727	1.733	1.728	1.732	1.730	1.734	1.730	1.736	1.732	1.731	1.738	0.26
17	1.855	1.860	1.868	1.861	1.866	1.864	1.868	1.864	1.870	1.866	1.866	1.873	0.26
18	1.894	1.899	1.907	1.901	1.906	1.904	1.908	1.904	1.910	1.906	1.906	1.913	0.26
19	1.944	1.949	1.957	1.951	1.956	1.954	1.958	1.954	1.961	1.956	1.956	1.964	0.27

表4 12批酢浆草药材样品HPLC指纹图谱共有峰的对峰面积

Tab 4 Relative peak areas of common peaks in HPLC fingerprint of 12 batches of *O. corniculata*

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	RSD,%
1	0.112	0.542	0.040	0.287	0.101	0.159	0.150	0.031	0.045	0.025	0.024	0.044	116.28
2	0.234	0.133	0.031	0.098	0.259	0.057	0.037	0.128	0.086	0.104	0.084	0.136	60.90
3	0.387	0.230	0.112	0.193	0.296	0.124	0.112	0.403	0.152	0.247	0.222	0.406	46.15
4	0.615	0.389	0.187	0.305	0.321	0.187	0.232	0.698	0.230	0.552	0.395	0.717	48.65
5	1.729	1.392	0.940	1.084	2.208	1.020	0.860	1.996	1.319	1.831	1.576	2.059	31.11
6	0.119	0.272	0.130	0.245	0.275	0.136	0.145	0.169	0.263	0.158	0.106	0.163	34.96
7	0.165	0.097	0.028	0.086	0.236	0.040	0.037	0.131	0.049	0.168	0.103	0.158	59.91
8	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
9	0.953	2.551	1.045	1.963	0.949	0.866	0.933	1.177	0.983	1.329	0.988	1.154	40.86
10	0.098	0.353	0.044	0.233	0.093	0.080	0.052	0.110	0.059	0.066	0.091	0.133	76.04
11	0.036	0.082	0.014	0.064	0.035	0.029	0.027	0.019	0.026	0.019	0.012	0.019	65.78
12	0.036	0.098	0.037	0.122	0.076	0.038	0.045	0.027	0.030	0.028	0.007	0.020	72.65
13	0.060	0.166	0.037	0.165	0.124	0.051	0.053	0.090	0.027	0.029	0.022	0.070	68.90
14	0.082	0.242	0.038	0.259	0.162	0.074	0.066	0.084	0.059	0.083	0.038	0.106	68.94
15	0.112	0.075	0.057	0.067	0.083	0.043	0.056	0.105	0.035	0.061	0.041	0.098	36.98
16	0.205	0.689	0.060	0.824	0.331	0.150	0.115	0.141	0.097	0.156	0.052	0.182	99.62
17	0.117	0.613	0.048	0.564	1.314	0.142	0.109	0.083	0.059	0.076	0.023	0.114	140.87
18	0.086	0.320	0.029	0.227	0.108	0.078	0.072	0.078	0.038	0.099	0.028	0.090	81.89
19	0.342	0.748	0.236	0.473	0.427	0.281	0.310	0.379	0.209	0.205	0.107	0.284	49.59

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 同“2.1.1”项。

2.2.2 溶液的制备 混合对照品溶液的制备同“2.1.2”项;供试品溶液的制备同“2.1.3”项;以甲醇为空白对照溶液。

2.2.3 系统适用性试验 取上述混合对照品溶液、供试品溶液、空白对照溶液各10 μL,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图3。结果,在该色谱条件下,空白对照对测定无干扰,各成分峰分离度较好,峰形对称,理论板数按异牡荆素峰计不低于30 000。

2.2.4 线性关系考察 分别精密量取“2.1.1”项下异牡荆素对照品贮备液0.02、0.09、0.15、0.20、0.30、0.60 mL,当药黄素对照品贮备液0.05、0.10、0.15、0.30、0.40、0.60 mL,置于6个5 mL量瓶内,分别用甲醇稀释至刻度,制成系列混合对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以各待测成分质量浓度(x, μg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归。结果,异牡荆素回归方程为 $y=0.423 1x+0.707 9(r=0.999 4)$ 、当药黄素回归方程为 $y=0.351 0x-0.469 1(r=0.999 2)$,表明异牡荆素、当药黄素分别在质量浓度3.91~117.36、9.88~118.56 μg/mL范围内线性良好。

2.2.5 定量限与检测限考察 分别精密量取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量,以甲醇为溶剂倍比稀释,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,分别以信噪比10:1、3:1计算定量限、检测限。结果,异牡荆素、当药黄素的定量限分别为0.675、3.587 μg/mL,检测限分别为0.205、1.087 μg/mL。

2.2.6 精密度试验 分别精密量取“2.1.1”项下各单一对照品贮备液0.30 mL,置于5 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀,按“2.2.1”项下色谱条件进样平行测定6次,记录峰面积。结果,异牡荆素、当药黄素峰面积的RSD分别为0.2%、0.2%(n=6),表明本方法精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:S2),分别于室温下放置0、3、6、9、12、24 h时,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,异牡荆素、当药黄素峰面积的RSD分别为0.8%、1.1%(n=6),表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.2.8 重复性试验 取酢浆草药材(编号:S2)粉末约1 g,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算样品含量。结果,异牡荆素、当药黄素的平均含量分别为0.524、0.724 mg/g, RSD分别为0.5%、0.9%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 取已知含量的酢浆草药材(编号:S2)粉末约0.5 g,共6份,精密称定,分别加入适量的“2.1.1”项下各单一对照品贮备液,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表5。

表5 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 5 Results of recovery tests(n=6)

待测成分	称样量, g	已知样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
异牡荆素	0.501 6	0.262 8	0.290 5	0.544 9	97.11	97.05	1.23
	0.501 0	0.262 5	0.290 5	0.542 8	96.49		
	0.501 8	0.262 9	0.290 5	0.540 2	95.46		
	0.498 5	0.261 2	0.290 5	0.543 1	97.04		
	0.499 6	0.261 8	0.290 5	0.543 9	97.11		
	0.502 2	0.263 2	0.290 5	0.551 1	99.10		
当药黄素	0.501 6	0.363 2	0.341 4	0.708 8	101.23	97.75	2.74
	0.501 0	0.362 7	0.341 4	0.705 5	100.41		
	0.501 8	0.363 3	0.341 4	0.689 2	95.46		
	0.498 5	0.360 9	0.341 4	0.687 0	95.52		
	0.499 6	0.361 7	0.341 4	0.687 2	95.34		
	0.502 2	0.363 6	0.341 4	0.700 1	98.56		

2.2.10 样品含量测定 取12批酢浆草药材样品粉末适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,平行测定3次,记录峰面积并按标准曲线法计算样品含量,结果见表6。

表6 样品含量测定结果(n=3, mg/g)

Tab 6 Results of content determination of samples(n=3, mg/g)

编号	异牡荆素	当药黄素	编号	异牡荆素	当药黄素
S1	0.227	0.850	S7	0.636	0.813
S2	0.543	0.726	S8	0.502	0.802
S3	0.831	1.131	S9	0.923	1.178
S4	0.286	0.801	S10	0.846	1.452
S5	0.491	0.641	S11	1.654	2.052
S6	0.666	0.772	S12	0.521	0.822

3 讨论

在前期预试验中,笔者采用二极管阵列检测器对样品在190~400 nm范围内进行紫外吸收扫描,发现检测波长为280 nm时峰形较好,基线较平稳,故选择280 nm为检测波长。同时,本研究比较了乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液、甲醇-0.1%甲酸水溶液、甲醇-0.1%磷酸水溶液等流动相系统的分离效果,发现以甲醇-0.1%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱时,各成分峰分离度较好、峰形对称,故选择甲醇-0.1%磷酸水溶液为流动相。此外,本研究分别对不同提取溶剂(100%、70%、50%、20%甲醇和100%、70%、50%、20%乙醇)、提取方法(超声提取和回流提取)、提取时间(15、30、60、90、120 min)进行了考察,发现在相同的色谱条件下,70%乙醇为提取溶剂时峰数较多、分离度较好、响应值较高,故选择70%乙醇为提取溶剂;超声提取和回流提取差异不明显,考虑到环保节能、操作简便等因素,最终选择超声提取;当超声30 min时色谱峰数较多,且30 min后提取率[在考虑指纹图谱整体色谱峰信息的同时结合异牡荆素、当药黄素的提取率(以这两个指标成分峰面积积)]无显著增加,故选择提取时间为30 min。

本研究结果显示,12批酢浆草药材样品的相似度均大于0.89,相对保留时间RSD均小于0.5%,但样品相对峰面积RSD较大,提示各批药材样品的化学成分一致性虽较好,但其含量存在差异,该结果与含量测定结果一致,其原因可能为酢浆草的生长可受环境、年限、采收时间、栽培等因素的影响^[18]。

综上所述,所建指纹图谱可用于酢浆草药材的质量控制;含量测定方法简便、准确,可用于同时测定其中2种成分的含量。

参考文献

- [1] 赵跃刚,王隶书,范艳君,等.酢浆草药材中总黄酮的含量测定[J].时珍国医国药,2011,22(1):81-82.
- [2] 贵州省药品监督管理局.贵州省中药材、民族药材质量标准:2003年版[S].贵阳:贵州科技出版社,2003:31.
- [3] 吴高兵,陈华,姚志云.苗药酢浆草的化学成分研究[J].中国民族医药杂志,2014,20(1):25-26.
- [4] IBRAHIM M, HUSSAIN I, IMRAN M, et al. Corniculatin A, a new flavonoidal glucoside from *Oxalis corniculata*[J]. *Rev Bras Farmacogn Braz J Pharmacogn*, 2013, 23(4):630-634.
- [5] KARUNANITHI S, RAJKISHORE VB, POL VG, et al.

Pharmacognostical and phytochemical studies on leaves of *Oxalis corniculata* Linn[J]. *J Phytopharmacol*, 2016, 5(6):225-229.

- [6] BADWAIK H, SINGH MK, THAKUR D, et al. The botany, chemistry, pharmacological and therapeutic application of *Oxalis corniculata* Linn: a review[J]. *Inter J Phyto-medicine*, 2011, 3(1):1-8.
- [7] 李中尧,何英姿,邱雪景.酢浆草生物活性的研究进展[J].安徽农业科学,2014,42(23):7750-7751,7962.
- [8] SREEJITH G, JAYASREE M, LATHA PG, et al. Hepatoprotective activity of *Oxalis corniculata* L. ethanolic extract against paracetamol induced hepatotoxicity in wistar rats and its in vitro antioxidant effects[J]. *Indian J Exp Biol*, 2014, 52(2):147-152.
- [9] DAS K, KATHIRIYA AK, KUMAR EP, et al. Evaluation of hepatoprotective activity of aqueous and ethanolic extract of *Oxalis corniculata* against intoxication of thioacetamide induced rats[J]. *Revista Brasileira De Farmacognosia*, 2012, 22(2):412-417.
- [10] KATHIRIYA A, DAS K, KUMAR EP, et al. Evaluation of antitumor and antioxidant activity of *Oxalis Corniculata* Linn. against ehrlich ascites carcinoma on mice[J]. *Iranian J Cancer Prevention*, 2010, 3(4):157-165.
- [11] 张宝,彭潇,何燕玲,等.酢浆草的化学成分研究[J].中药材,2018,41(8):1883-1886.
- [12] 孔秋玲,赵瑞瑞,邹江冰,等. HPLC法测定紫果西番莲叶中异牡荆素的含量[J].西南国防医药,2012,22(11):1168-1170.
- [13] 江南,许晓燕,余梦瑶,等.当药黄素抗抑郁作用研究[J].天然产物研究与开发,2019,31(1):129-134,162.
- [14] 刘文,蒋世云.中药指纹图谱研究与应用进展[J].中国药房,2011,22(19):1819-1822.
- [15] 马雪,吴莹莹,贺亚都,等.苗药酢浆草药材的质量标准研究[J].中国药房,2019,30(15):2091-2095.
- [16] 冯华,邓丽娟,吴林菁,等.酢浆草高效液相色谱指纹图谱的鉴别研究[J].时珍国医国药,2014,25(10):2414-2416.
- [17] 吴林菁,冯华,吴红梅,等.酢浆草的UPLC指纹图谱研究[J].广西植物,2017,37(9):1195-1203.
- [18] 华国栋,郝庆秀,格小光,等.中药材质量变异概述[J].中国现代中药,2014,16(6):510-515.

(收稿日期:2019-07-23 修回日期:2020-02-07)

(编辑:陈宏)

《中国药房》杂志——中文核心期刊,欢迎投稿、订阅